第 42 卷 第 3 期
1999 年 8 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.42, No.3
Aug., 1999

淡色库蚊酯酶等位基因及其在自然种群中的频率分布*

王金福** 陈 睿 陆绍红
（浙江省医学科学院寄生虫病研究所，杭州 310013）
徐建农
（第二军医大学寄生虫学教研室，上海 200433）

摘要 酯酶基因扩增所产生的酯酶活性升高是库蚊 *Culex pipiens* 对有机磷杀虫剂抗性的主要机理之一。采用分子杂交技术和限制性酶切片段长度多态性（RFLP）分析，已鉴定出多种酯酶等位基因类型。该文通过酯酶基因特异性片段的 PCR 扩增及扩增片段的酶切片段分析，对淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 四种有机磷抗性品系的酯酶等位基因进行分型，并测定分析自然种群中不同酶型的频率分布。研究结果表明：PCR 分型方法具有快速、准确的特点。不同的有机磷杀虫剂对酯酶等位基因具有明显的选择作用。双硫磷品系为 B_1 型；毒死蜱和敌百虫品系为 B_2 型；马拉硫磷品系为 B_1 型和 B_1/B_2 杂合型。不同地区采集的种群表现出不同的酶型频率分布。该文就杀虫剂对酯酶等位基因选择作用及自然种群的酶型频率分布进行了讨论。

关键词 有机磷，抗性，淡色库蚊，酯酶基因，PCR 分型

在尖音库蚊复合种群 *Culex pipiens* complex 中，两类羧酸酯酶（A 和 B）活性的升高是其对有机磷杀虫剂产生抗性的最常见机理，而酯酶活性升高是由其结构基因扩增造成的[1]。至今在世界范围内已从尖音库蚊的自然种群中鉴定出 A_1、B_1、A_2/B_2、A_4/B_4、A_5/B_5、B_6 和 B_7 等高活性的酯酶类群[2~5]。不同的酯酶类型表现出不同的地理分布[2,4,6~10]。此外，不同酯酶对不同有机磷杀虫剂的抗性水平有一定的差异[11]，并且不同种类的有机磷杀虫剂会引起种群中不同高活性酯酶频率的改变[12~14]。自然种群中蚊虫高活性酯酶的鉴定多采用酯酶电泳方法，实验室的鉴定多采用酯酶基因特异性探针杂交方法和限制性内切酶酶切片段长度多态性（RFLP）方法[5,10]。本文通过 4 种有机磷杀虫剂（敌百虫、双硫磷、马拉硫磷和毒死蜱）的多代抗性筛选、单卵块传代、酯酶电泳特性分析等，建立了四种（三种酶型）的有机磷抗性品系。在对 B 酯酶基因扩增区保守片段 PCR 扩增的基础上，采用限制性酶切片段分析方法，对四种抗性品系进行酯酶等位基因分型。同时，根据基因分型标志和酯酶电泳，对自然种群中不同酶型的频率分布进行分析。

---

* 浙江省自然科学基金资助项目
** 现工作单位：浙江大学生命科学学院，邮编 310028
1998-02-09 收稿，1998-10-26 收修改稿

1 材料和方法

1.1 材料

杀虫剂：敌百虫（95%），马拉硫磷（95%）和双硫磷（94%），来自浙江省农业科学院农药室；毒死蜱（90%），来自浙江农业大学农药室。

蚊虫：酯酶 B_1、B_2 和 B_4 品系蚊 DNA 由法国 Montpellier Ⅱ大学的 Michel Raymond 博士提供。4 种有机磷抗性品系为本养虫室经过多代单卵块传代并抗性筛选的品系，通过对来自各卵块的 4 龄幼虫进行酯酶电泳测定，合并饲养相同酶型的幼虫，并如此传代，直至进行酯酶基因 PCR 分型。

自然种群的蚊虫采自杭州和金华两地郊区的孳生地的卵块。采集的卵块于养虫室内饲养至 4 龄幼虫时，每个种群中随机挑取 40～60 头幼虫分别进行酯酶电泳后统计不同泳动率的酶型概率。同时对金华地区种群的其余幼虫分别进行 4 种有机磷杀虫剂的抗性品系筛选，筛选的剂量为 60%～70%致死剂量。在逐代筛选中，测定每代各抗性品系的酶型概率，直至第 5 代每种抗性品系的酶型趋向一致。

1.2 方法

酯酶电泳：按徐建农等[14]方法制备聚丙烯酰胺凝胶电泳，胶浓度为 7.5%。单个幼虫用 10 μL 匀浆液（0.063 mol/L Tris-HCl，0.5% Triton，10%甘油和适量溴酚兰）匀浆。酯酶用等量混合 α-和 β-醋酸萘酯染色。

DNA 提取：用酚/氯仿抽提法[15]从单个 4 龄幼虫中提取基因组 DNA。

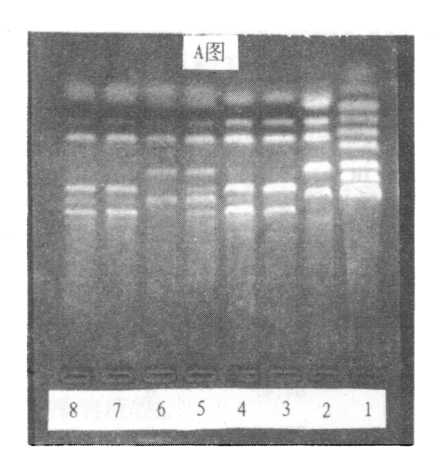
PCR 分型：根据酯酶 B_1 和 A_1 基因序列[16]分别设计引物(5’GAGAAGCTTCTGACGGACCAG 3’和 5’ACATTGCGTCCCACTATGTC 3’)与(5’CCTTCGCCAACTTCTCAACCC 3’和 5’ACTTCATTCGTTCCTGCTCCG 3’)。PCR 反应体积为 50 μL，反应液中含 25 mmol/L Tris (pH6.8)，25 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，1 mmol/L $MgCl_2$，0.01%明胶，4 种 dNTP 各 0.15 mmol/L，引物各 0.2 μmol/L，1U Taq DNA 聚合酶，单个蚊 DNA 2 μL（单蚊 DNA 总量的 2/50）。94℃变性 2 min 后，按如下条件在热循环仪（Perkin Elmers 公司，480 型）作 30 次循环；94℃ 30 s，50℃ 30 s，72℃ 30 s。扩增片段约为 900 bp。

扩增片段酶切：用 *Rsa* Ⅰ酶酶切。酶切反应体积为 15 μL（*Rsa* Ⅰ酶 0.2 μL（2U/μL)、10×反应缓冲液（Promega kit）1.5 μL、扩增产物 13 μL)。反应液在 37℃下温育 1.5 h。然后进行 2%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 酯酶等位基因的 PCR 分型标志

实验室内的 4 种有机磷抗性品系在每代保持 70%～80%致死剂量的相应杀虫剂压力下，进行单卵块传代，并通过酯酶电泳分析，确定出相应于 4 种有机磷的三种酶型。这三种酶型经酯酶基因扩增片段的酶切片段分析，并与标准蚊品系 DNA 的酶切片段比较分析，分别确定为 B_1 和 B_2 纯合型及 B_1/B_2 杂合型（图 1），其中双硫磷抗性品系为酯酶 B_1 型，敌百虫和毒死蜱抗性品系为酯酶 B_2 型，马拉硫磷抗性品系中只有酯酶 B_1/B_2 杂合型存在。



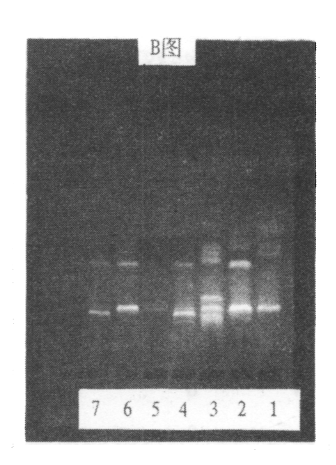


图 1　不同品系库蚊酯酶 B 基因（A）和酯酶 A 基因（B）的 PCR 扩增产物的酶切片段电泳图谱

Fig.1　Electrophoretogram of PCR products from esterase B genes (A) and esterase A genes (B) in each resistant strain

图 A 中，1 = Marker，2 = B_1，3 = B_2，4 = B_4，5 = 马拉硫磷品系（malathion），6 = 双硫磷品系（temephos），7 = 毒死蜱品系（chlorpyrifos），8 = 敌百虫品系（trichlorphon）；

图 B 中，1 = A_1，2 = A_2，3 = A_4，4 = 马拉硫磷品系（malathion），5 = 双硫磷品系（temephos），6 = 毒死蜱品系（chlorpyrifos），7 = 敌百虫品系（trichlorphon）

2.2　自然种群中酯酶类群的概率

现场采集的当代 4 龄幼虫酯酶电泳结合上述 PCR 分型标志分析，表明杭州和金华两地种群的酯酶等位基因类型的频率分布有所不同（表 1）。杭州地区和金华地区的种群中酯酶 B_1 型类群都占主要优势，但杭州地区种群频率相对较低的是 B_1/B_2 杂合型类，金华地区的种群中酯酶 B_2 型类群的频率较低。两地种群中抗性酯酶类群概率总和大于种群中敏感类群的概率。

2.3　有机磷杀虫剂对酯酶类群的选择作用

从表 1 的数据来看，金华地区种群中敏感类群还占有一定的比例。但经过一代的有机磷杀虫剂筛选后，无论是那一种杀虫剂的作用，种群中的敏感类群全部被淘汰，只剩下抗性酯酶类群（表 2）。同时，种群中的各种酯酶等位基因类群比率发生了变化。在筛选后的第 2 代中，种群中的抗双硫磷品系中酯酶 B_1 型类群比率明显升高，酯酶 B_2 型类群完全消失，酯酶 B_1/B_2 杂合型类群虽还存在，但和酯酶 B_1 型类群

表 1　自然种群中不同抗性酯酶类群的频率(%)分布 *

Table 1　Percentage (%) of each esterase phenotype in the natural population

酶型 Esterase phenotype	种群 Population 杭州 Hangzhou	金华 Jinhua
B_1	39.43	35.54
B_2	12.15	10.86
B_1/B_2	7.88	20.17
敏感（S）	40.54	33.43

* 杭州种群测定 120 头蚊虫，金华种群测定 115 头蚊虫

* 120 individuals in the Hangzhou population and 115 individuals in the Jinhua population were measured

的比率差异明显拉开；在抗敌百虫和毒死蜱品系中，酯酶 B_2 型类群比率升高，而酯酶 B_1 型和酯酶 B_1/B_2 杂合型类群的比率则相对降低；抗马拉硫磷品系中酯酶 B_2 型类群也完全消失，酯酶 B_1 型和酯酶 B_1/B_2 杂合型类群的比率都有显著提高。

表 2 种群中抗性酯酶对不同有机磷杀虫剂的选择优势（金华）

Table 2 Selective advantage of each esterase phenotype in the Jinhua population to different OP insecticides

世代 Generation	双硫磷 Temephos				马拉硫磷 Malathion			
	B_1	B_2	B_1/B_2	S	B_1	B_2	B_1/B_2	S
1*	35.54	10.86	20.17	33.43	35.54	10.86	20.17	33.43
2	79.12	0	20.88	0	57.82	0	42.18	0
3	92.54	0	7.46	0	64.47	0	35.53	0
4	100	0	0	0	78.25	0	21.75	0
5					79.36	0	20.64	0

世代 Generation	敌百虫 Trichlorphon				毒死蜱 Chlorpyrifos			
	B_1	B_2	B_1/B_2	S	B_1	B_2	B_1/B_2	S
1	35.54	10.86	20.17	33.43	35.54	10.86	20.17	33.43
2	31.24	43.16	25.60	0	25.33	47.55	27.12	0
3	10.55	72.02	17.43	0	5.27	90.18	4.55	0
4	0	93.58	6.42	0	0	100	0	0
5	0	100	0	0				

* 两世代间各酶型频率有显著性差异（t 检验，$P<0.05$）；各品系的第1～2代测定85头，第3～4代测定70头，第5代测定65头

* Difference of frequencies of esterase types between each two generations is significant（t test，$P<0.05$）；For each strain，85 individuals in 1st and 2nd generations，70 individuals in 3rd and 4th generations，and 65 individuals in 5th generation were measured

随着以后各代相应有机磷的继续筛选，两地种群中各抗性品系的酯酶等位基因类群逐渐趋向单一；抗双硫磷品系在第 4 代已全部表现为酯酶 B_1 型类群，抗敌百虫品系在第 5 代及抗毒死蜱品系在第 4 代都表现为酯酶 B_2 型类群，抗马拉硫磷品系则在第 5 代时酯酶 B_1 型和酯酶 B_1/B_2 杂合型类群都存在，但前者明显大于后者。有机磷对自然种群的最后筛选结果与实验室单卵块传代的相应抗性品系的酯酶等位基因类型是比较一致的。

3 讨论

在有机磷抗性库蚊中，酯酶基因扩增导致酯酶过度产生，高活性的酯酶通过结合或水解有机磷而起到解毒作用，成为库蚊产生抗药性的主要机制之一。不同的有机磷杀虫剂在其化学结构上存在一定的差异。近年来的研究表明，不同的有机磷杀虫剂可能诱导不同的酯酶扩增，即不同的酯酶等位基因对不同的有机磷杀虫剂具有不同的选择优势。Villani & Hemingway（1987）和 Bonning 等（1991）的研究结果表明，在意大利使用毒死蜱时库蚊种群中酯酶 A_1 的类群比率升高，而换用双硫磷后，酯酶 B_2 的活性升高，取代酯酶 B_1 类群而成为主要的

抗性类群[12,13]。Hemingway 等（1990）用 6 种有机磷杀虫剂对现场原来酯酶 B_2 类群占优势的致倦库蚊种群进行筛选，结果酯酶类群比率发生了很大的变化[11]。徐建农等（1994）对我国佛山的致倦库蚊也进行了两种有机磷杀虫剂的选育，发现在马拉硫磷较低剂量的选择下，酯酶 B_1、B_1/B_2 和 B_1/B_3 类群比率都有所升高，其中 B_1 和 B_1/B_2 类群较为明显；但在高剂量的压力下，仅有酯酶 B_1 类群存活下来[14]。本文中的结果却有所不同，实验室的抗马拉硫磷品系仅发现为酯酶 B_1/B_2 杂合型类群，而对现场种群的筛选数代后却是 B_1 和 B_1/B_2 两种类群都存在。估计实验抗性品系中未有 B_1 类群是可能在进行单卵块传代中疏漏所致；现场种群的筛选结果还有 B_1/B_2 杂合型类群存在，这与徐建农等（1994）高剂量筛选结果有一定差异，推测可能与筛选中使用的剂量不同有关，这有待于进一步研究。我们的实验抗性品系和现场蚊虫的有机磷筛选研究结果也同样表明，在抗性库蚊中，不同的酯酶等位基因类群对不同的有机磷有不同的选择响应性。

以前对库蚊抗性酯酶等位基因分型的方法通常是采取探针杂交法[14,16]和限制性酶切长度多态性（RFLP）分析法[4,7,10]。前者是用同位素标记标准的酯酶 B cDNA 探针，与样本基因组进行杂交，或是标记样本基因组中酯酶基因的保守性 PCR 片段，再与标准的酯酶基因进行杂交；后者则是对样品的基因组进行酶切，并根据酶切片段多态性进行分型。探针杂交法精确性较高，但因涉及到制备探针，比较烦琐；RFLP 法虽然较简便，但因不同长度的酶切片段较多，酶切片段的电泳图谱直观性不强，并且由于单蚊基因组 DNA 较微量，存在重复性不够问题。本文中所采用的酯酶基因保守片段 PCR 扩增方法，解决了单个蚊虫基因组微量的问题，并且酶切片段较为简单，作为分型标志直观性较强，由此结合蚊虫个体的酯酶电泳图谱分析，可进行自然群体中蚊虫酯酶类群的测定。

徐建农等（1994）测定广东佛山市的现场致倦库蚊种群，发现存在酯酶 B_1、B_2、B_3、B_1/B_2、B_1/B_3、B_2/B_3 等纯合或杂合型类群[14]；乔传令等（1996）分析北京库蚊 *C. pipiens* 品系为 B_1 型[10]。根据前人及我们的研究，表明我国库蚊中，抗性酯酶等位基因类群是比较丰富的，至目前为止，至少存在 5 种纯合型类群以及数种杂合型类群。杭州和金华两地长期使用化学农药灭蚊，早年使用敌百虫，至 80 年代初开始使用马拉硫磷和敌敌畏，在 80 年代末至 90 年代初使用的有机磷包括双硫磷、倍硫磷及杀螟松等，近期在杭州地区还有使用马拉硫磷的现象。根据两地的使用有机磷杀虫剂的历史及现状来看，早期马拉硫磷和敌百虫的使用选择了酯酶 B_1 和 B_2 类群的存在，以后不同有机磷杀虫剂的使用将这两种酶型类群维持在一定频率，并且这种频率可能会随着不同有机磷杀虫剂的轮换使用而发生变化。对两地种群中出现的 B_1/B_2 杂合型类群，其起源以及以后的遗传趋势现在还不清楚，值得进一步研究。总之，加强蚊虫抗性酯酶类群的监测，根据不同时期的各类群频率，采用相应的杀虫剂，这对提高灭蚊防病的效果是必要的。

参 考 文 献 （References）

1 Mouches C, Pasteur N, Berge J *et al*. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex pipiens* mosquito. Science, 1986, 233: 778～780

2 Pasteur N, Singre G, Gabinaud A. Est-2 and Est-3 polymorphism in *Culex pipiens* L. from southern France in relation to organophosphate resistance. Biochem. Genet., 1982, 19: 499～508

3 Raymond M, Pasteur N, Georghious G P *et al*. Detoxification of esterases new to California, USA, in organophosphate-resistant *Culex quinquefasciatus*. J. Med. Entomol., 1987, 24: 24～27
4 Poirie M, Raymond M, Pasteur N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from Mediterranean countries. Biochem. Genet., 1992, 30: 13～26
5 Xu J, Qu F, Liu W. Diversity of amplified esterase B genes responsible for organophosphate resistance in *Culex quinquefasciatus* from China. Acad. J. Second Milit. Med. Univ., 1994, 15: 101～105
6 Pasteur N, Georghious G P. Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Econ. Entomol., 1989, 82: 347～353
7 Raymond M, Callaghan A, Fort P *et al*. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. Nature (Lond), 1991, 350: 151～153
8 Severini C, Romi R, Marinucci M *et al*. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Culex pipiens* from Italy. J. Amer. Mosq. Cntr. Ass., 1993, 9: 164～168
9 Raymond M, Marquine M. Evolution of insecticide resistance in *Culex pipiens* population: the corsican paradox. J. Evol. Biol., 1994, 7: 315～337
10 乔传令，黄 瑶，Raymond M. 不同地域有机磷杀虫剂抗性库蚊复合组酯酶 B_1 扩增的研究. 昆虫学报，1996，39 (3)：225～232
11 Hemingway J, Callaghan A, Amin A M. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. Med. Vet. Entomol., 1990, 4: 275～283
12 Villani F, Hemingway J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbmate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. Pestic. Biochem. Physiol., 1987, 27: 216～228
13 Bonning B C, Hemingway J, Romi R *et al*. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy in response to changing insecticide selection pressure. Bull. Entoml. Res., 1991, 81: 5～10
14 徐建农，瞿逢伊，刘维德. 有机磷杀虫剂对致倦库蚊群体抗性相关酯酶的选择作用. 中国媒介生物学及控制杂志，1994，5 (4)：241～243
15 Raymond M, Beyssat-Arnaouty V, Sivasubramanian N *et al*. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. Biochem. Genet., 1989, 27: 417～425
16 Mouches C, Pauplin Y, Agarwal M *et al*. Characterization of amplification core and esterase B_1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1990, 87: 2 574～2 578

PCR IDENTIFICATION AND PROBABILITY OF AMPLIFIED ESTERASE GENES IN *CULEX PIPIENS PALLENS*

Wang Jinfu　Chen Rui　Lu Shaohong
(Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013)
Xu Jiannong
(Department of Parasitology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Organophosphate insecticide (OP) resistance in mosquitoes of *Culex pipiens* complex has been shown to be correlated with the increase in esterase activity resulting from overproduction of the esterase due to amplification of the corresponding structural gene. Several esterase B loci have been identified with Southern hybridization and restriction fragment length polymorphism (RFLP). In this paper, esterase B loci in four OP-resistant strains of *Culex pipiens pallens* were identified with the restriction analysis of

PCR fragments. The results indicate that various esterase loci have different selective advantages under different OP pressures. B_1 gene was amplified in temephos-resistant strain, and B_2 gene was amplified in trichlorphon and chlorpyrifos-resistant strains. The hybridzygote of B_1 and B_2 genes was detected in the malathion-resistant strain. Different natural populations of *C. pipiens pallens* have different probability of B gene distribution. These results are discussed in relation to the selective advantage of esterase genes to OP pressure and mosquito control strategies.

Key words organophosphate, resistance, *Culex pipiens pallens*, esterase gene, PCR identification